

Prof. Dr. Bent H. Hausteen

Director del Instituto de Bioquímica de la Universidad de Kiel (Alemania)
(Traducido del alemán por el Dr. R. Varón Castellanos)

INTRODUCCIÓN

La etanolamina quinasa y la colín quinasa, estrechamente relacionada con ella, son enzimas clave en la biosíntesis de fosfolípidos, que por otra parte son componentes funcionales decisivos de las membranas biológicas. Ya que la actividad de enzimas importantes unidas a membranas, como la acetilcolinesterasa y las fosfolipasas, depende de la presencia de fosfolípidos específicos, un defecto congénito en el gen de la etanolamina quinasa o de la colín quinasa tiene un efecto amplio en fallos de procesos vitales como la dirección nerviosa, el crecimiento y el transporte iónico a través de membranas. La consecuencia será un desarrollo muy retrasado del cuerpo y de las capacidades intelectuales, así como una temprana muerte del paciente.

Nosotros estuvimos interesados en estudiar la cinética de la etanolamina quinasa por dos razones. Por una parte, porque las quinasas, a pesar de su gran importancia bioquímica como enzimas reguladoras clave del metabolismo, han sido hasta ahora poco investigadas debido a su complejidad y gran dificultad de su purificación. Por otra parte, porque había un motivo especial, pues en nuestra clínica infantil universitaria se descubrió una nueva enfermedad congénita, cuya explicación debía llevar a cabo un instituto de bioquímica. Estábamos, pues, obligados a asumir la tarea.

ENFERMEDAD CONGÉNITA ETANOLAMINOSIS

Voy a describir muy brevemente la enfermedad congénita, ya que la cinética de la reacción catalizada por la enzima mencionada juega un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad. Un niño de unos 2 meses de edad de un pueblo cerca de Kiel fue ingresado en la clínica universitaria de Kiel debido a su desarrollo insuficiente. Su sistema nervioso funcionaba muy mal y algunos de sus órganos, como el hígado, el corazón y el bazo eran de un tamaño doble que el normal. Además, los equilibrios de agua y electrolitos estaban alterados, por lo que el niño vomitaba a menudo y apenas tomaba alimento. Su analítica era normal, excepto que en la orina encontrábamos una concentración alta de etanolamina. Los pediatras opinaban que el gigantismo de los órganos era debido a una acumulación de metabolitos. Por ello analizamos una prueba de biopsia y confirmamos la hipótesis. La sustancia acumulada era etanolamina. Una mirada a los diagramas bioquímicos del metabolismo identificó enseguida a la etanolamina quinasa como la enzima cuya alteración podía explicar la acumulación de etanolamina.

EL AISLAMIENTO DE LA ENZIMA

Nuestra tarea siguiente fue la extracción e investigación de esta enzima. Desafortunadamente encontramos poca ayuda en la literatura, pues hasta entonces sólo había sido investigada en plantas y en cerebro de ratas, pero no en animales superiores ni personas. La enzima está unida principalmente a las membranas intracelulares, como las del retículo endoplasmático y por lo tanto es difícil aislar sin una gran pérdida de su actividad. Por aquel entonces sólo disponíamos de los cromatógrafos clásicos, equipos de electroforesis y centrífugas. Habíamos utilizado estos aparatos durante años sin poder extraer electroforéticamente una enzima homogénea. Sólo después de adquirir un equipo de cromatografía de alta presión para FPLC y HPLC, conseguimos este objetivo. La purificación presenta dos complicaciones. Primeramente, la etanolamina quinasa estaba fuertemente unida a la ribonucleasa, la cual hidroliza enseguida nuestro producto, la etanolamina fosfato. Pero aprendimos pronto a destruir selectivamente con un ácido esta ribonucleasa. En segundo lugar había presentes muchas isoenzimas, entre ellas la colín quinasa, que estructural y funcionalmente se asemejan considerablemente a la etanolamina quinasa. Además los pediatras tan sólo nos habían proporcionado 1 g de tejido de hígado patológico, con el cual debíamos de llevar a cabo todo el proyecto. Por lo tanto tuvieron que hacerse muchos experimentos cinéticos con un preparado parcialmente purificado. Sin embargo, pudimos probar que en la enzima patológica la actividad específica y la relación K_{cat}/K_M (constante catalítica/constante de Michaelis) estaban disminuidas aproximadamente en un 70% y que ello era fundamentalmente debido a una disminución del valor de k_{cat} , mientras que el valor de K_M , variaba muy poco. La mutación había afectado preferentemente al centro catalítico. Hicimos pruebas de comparación con enzimas normales procedentes de autopsias, principalmente de víctimas de tráfico. Con esta ocasión comprobamos la evolución de la actividad específica con la edad de las personas. Es alta en el periodo perinatal y disminuye insignificamente hasta la edad de 50 años. Después

disminuye mucho y en personas de 70 años tiene ya un valor igual a la cuarta parte del inicial. Este valor corresponde al de los niños mutados, es decir, ellos ya son viejos en el nacimiento, desde el punto de vista de la actividad de la etanolamina quinasa.

Unos años después del descubrimiento del primer niño etanolaminósico, nació un segundo niño, una niña, de los mismos padres del primero. Tenía los mismos síntomas y los mismos parámetros cinéticos de la etanolamina quinasa que su hermano y murió, como aquél, a una edad de unos 18 meses, de fallo cardíaco. Un hijo mayor de estos mismos padres era, como ellos, normal. Un tercer caso, en otra familia, pero que afectaba a otra etapa de la biosíntesis de fosfolípidos, ocurrió poco después del segundo caso, pero no teníamos capacidad suficiente para explicar también fundamentalmente, este caso. Posteriormente se dirigió a nosotros un colega noruego que había leído nuestro artículo, y nos informó de su descubrimiento de un caso de etanolaminosis en Oslo. A pesar del escaso número de casos, esta enfermedad congénita podría estar más extendida de lo que al principio se había pensado, pues aproximadamente la mitad de los niños muertos prematuramente se enterraban sin diagnóstico.

EL EXPERIMENTO ENZIMÁTICO

La actividad de la etanolamina quinasa se determinó con ^{14}C -C2 etanolamina de radiactividad específica conocida. Una vez transcurrido el tiempo de reacción elegido se desnaturalizó la enzima mediante 2 minutos de ebullición. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se centrífugo. Una muestra del sobrenadante se pasó por una columna de intercambio iónico que retenía la etanolamina que no había reaccionado, mientras que el fosfato de etanolamina se pasaba. Se lavó la columna y el fluido recogido se midió en un contador de centelleo. El producto, etanolamina fosfato, fue identificado mediante cromatografía de capa fina por comparación con un patrón.

CINÉTICA DE LA ETANOLAMINA QUINASA

La etanolamina quinasa muestra la cinética clásica de Michaelis-Menten a concentraciones de etanolamina de hasta 2 nM, cuando la enzima se satura con Mg-ATP en una relación óptima 3:2. El complejo Mg-ATP debe por lo tanto, estar en una forma eléctricamente neutra. En todos los experimentos se inició la reacción con una fase rápida, que era seguida por una fase de estado estacionario. Este curso de la reacción es típico de los procesos enzimáticos que transcurren mediante una etapa intermedia lenta, que acumulan metabolitos en la etapa lenta. La causa de la existencia de una etapa determinante de la velocidad es, frecuentemente, que tiene lugar un cambio de conformación de la enzima, antes de que uno o más productos puedan ser formados. La existencia de este cambio de conformación podía ser investigada independientemente mediante la valoración espectrofotométrica de los restos de tirosina, pues la curva de valoración muestra un punto de inflexión dependiente del tiempo tan pronto como el valor del pH sobrepasa de 10. Ya que los cambios locales de pH se dan a menudo en reacciones enzimáticas, la variación de estructura inducida por el pH muy probablemente podría ser idéntica a la que se produce en la reacción enzimática.

La existencia de una fase de reacción rápida en una reacción enzimática permite una estimación directa de la normalidad operacional de los centros activos. Cuando ésta se compara con la normalidad conocida de las proteínas, puede calcularse el número de centros activos en la molécula. El resultado fue 1,08_0,05 centros activos, es decir, las dos proteínas que forman la enzima de hígado humano, el dímero, son activas. Aún no está claro si entran en acción simultáneamente, al azar o alternativamente.

LA TEORÍA CINÉTICA

En esta fase del análisis del mecanismo fue necesario encontrar un modelo sencillo que pudiera satisfacer las observaciones. Primeramente supusimos que el orden de unión de los dos sustratos, ATP y etanolamina, era al azar, es decir, los correspondientes sitios de unión de la enzima son independientes uno de otro. Contra esta suposición general estaba la fase de transición rápida que probablemente acabaría en un cambio conformacional de la proteína, pues esta observación indica un orden en la unión de sustratos. Ya que la etanolamina es más hidrófoba que el ATP, el cambio de conformación vendrá provocado probablemente por la unión de la etanolamina. Por consiguiente, el ATP debería ser el primer sustrato unido y la etanolamina el segundo. Normalmente, la variación de la conformación de una enzima inducida por un sustrato activa el centro activo. En todas las quinasas conocidas se transfiere un resto fosfato del ATP a una cadena lateral de la serina, formando un enlace tipo éster. En la etapa siguiente se transfiere el resto de ácido fosfórico al grupo alcohol de la etanolamina. Teóricamente el ADP podría abandonar la enzima inmediatamente después de la formación del éster con la serina. Sin embargo, es probable que la conformación activa de la enzima, que debe ser compacta e hidrófoba para evitar una hidrólisis del intermedio, se relaje sólo después de la formación del segundo producto, es decir, la enzima vuelva a su conformación original no activa, en la que los dos productos se liberan casi simultáneamente.

Una ventaja del orden obligado de las reacciones de asociación y disociación es una mayor facilidad en el análisis de datos. Una variante del mecanismo ordenado es el modelo Ping-Pong. Según este, el primer producto, ADP, abandona la enzima tan pronto como el éster de serina se ha formado y antes de que se una la etanolamina. Sin embargo, este modelo no

es probable debido al cambio de conformación, que apenas permite una formación previa de ADP. Por lo tanto, el modelo se deduce al siguiente esquema:

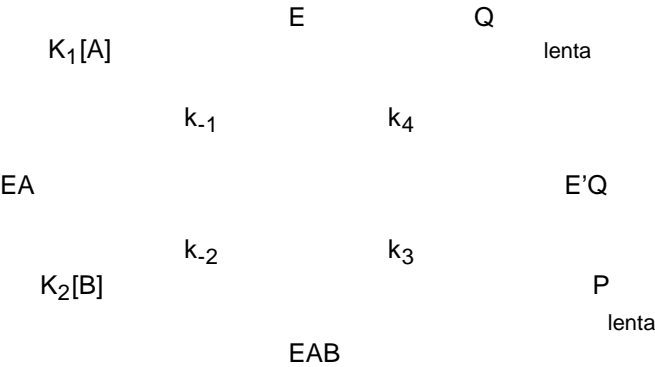


en el que las reacciones de unión y las de fosforilación son mucho más rápidas que los cambios de conformación. La inhibición por el sustrato observada podría ser alostérica. Podría consistir, por ejemplo, en que un cambio de conformación en una de las subunidades del dímero bloqueara el centro activo de la otra subunidad. Cuando las dos subunidades están unidas fuertemente entre sí en el dímero, la transposición de una de ellas podría arrastrar a la otra, también en ausencia de una segunda molécula de etanolamina unida. La segunda molécula tendría que recorrer entonces un ciclo vacío. Por ejemplo, en el caso del cerdo la enzima correspondiente fue un monómero.

EVALUACIÓN DE LOS DATOS

El modelo descrito es válido para muchos tipos de enzima como p. ej. las hidrolasas, las transaminasas y las ATP-asas. Es simétrico y satisface por lo tanto el principio de reversibilidad microscópica. La enzima puede estar presente en dos conformaciones: una forma suelta inactiva con muchas moléculas de agua en el centro activo, con acceso libre a los puntos de unión de sustrato y rápidas interacciones de enlace, y otra en forma densa y activa, sin moléculas de agua en el centro activo y con los puntos de unión del sustrato bloqueados. El cambio de conformación entre los dos estados es lento, cooperativo y determinante de la velocidad a causa de muchas interacciones hidrófobas. Esto se puede considerar como una transformación crítica de fases.

Las ecuaciones analíticas para los parámetros k_M y k_{cat} de la velocidad dinámica así como para el salto rápido al principio de la reacción, τ , en función de las constantes de velocidad y de las concentraciones de sustrato se conocen para ambos sustratos. Esto está esquematizado en el siguiente modelo simplificado, en el cual el cambio de conformación es simultáneo con la reacción de eliminación del producto, que se considera irreversible:



El tiempo de duración del ensayo no permitió la determinación de la dependencia de τ_3 , por lo que una valoración más amplia de los parámetros cinéticos sólo será posible cuando la cantidad de enzima disponibles para experimentos de relajación química sea suficiente. El conjunto de constantes de velocidad probables se obtuvo mediante la iteración de las curvas de progreso.

SONDA GENÉTICA

Las técnicas genéticas modernas permiten ahora la obtención de grandes cantidades de una proteína después de determinar partes de la secuencia de aminoácidos. Por eso, hemos obtenido mediante hidrólisis triptica limitada algunos péptidos que después de una alta purificación mediante HPLC fueron secuenciados a partir del aminoácido N-terminal. Estas

secuencias parciales permiten, con ayuda del código genético, la síntesis de cDNA-oligonucleótidos, que después de marcado radiactivamente se pueden utilizar para marcar los genes y para el aislamiento del gen de la etanolamina quinasa intacto. Tales sondas de genes específicas tienen la aplicación práctica de poder indicar antes del nacimiento de un niño con un factor de riesgo pequeño la presencia del gen normal o mutado en muestras del líquido amniótico. Por lo tanto, es posible ahorrar al niño una vida penosa practicando un aborto temprano.

La enfermedad aquí descrita, la etanolaminosis, recientemente descubierta, esté quizás no sólo más extendida de lo que en un principio se había pensado, sino que posiblemente pertenezca también al temido "Sudden Infant Death Syndrome" (síndrome de muerte súbita infantil). Este es un grupo de enfermedades que se manifiestan en una parada repentina de la respiración y del latido cardíaco. Se originan por defectos en los fosfolípidos de las membranas neuronales: falta p.ej. la fosfatidilcolina en la sinapsis, y la actividad de la acil-coenzima-A transferasa para los ácidos grasos de cadena media es escasa. Mientras un defecto en la sinapsis del centro respiratorio en el cerebro puede llevar al paciente a una muerte inmediata, el significado de la aciltransferasa permanece aún sin aclarar. Ya que todos los procesos vitales están catalizados por enzimas, el estudio de la cinética de estas reacciones es una tarea primordial de los bioquímicos.

ECUACIONES

$$V_p^{ss} = [E_0] \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [A] [B]}{(k_1 [A] + k_{-1}) (k_{-2} + k_3) k_4 + k_2 [B] (k_1 [A] (k_3 + k_4) + k_3 k_4)}$$

$$K_{cat}^A = \frac{k_2 k_3 k_4 [B]}{k_4 (k_{-2} + k_3) + k_2 [B] (k_3 + k_4)}$$

$$K_{cat}^B = \frac{k_1 k_3 k_4 [B]}{k_3 k_4 + k_1 [A] (k_3 + k_4)}$$

$$K_M^A = \frac{k_4 [k_{-1} (k_{-2} + k_3) + k_2 k_3 [B]]}{k_1 [k_4 (k_{-2} + k_3) + k_2 [B] (k_3 + k_4)]}$$

$$K_M^B = \frac{k_4 (k_1 [A] + k_{-1}) (k_{-2} + k_3)}{k_2 [k_1 [A] (k_3 + k_4) + k_3 k_4]}$$

$$[A] = \text{const.} \quad [B] = \text{const.}$$

$$p_p = p_Q = \frac{E_0}{3} \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [A] [B]}{(k_1 [A] + k_{-1}) (k_{-2} + k_3) k_4 + k_2 k_3 k_4 [B] + k_1 k_2 (k_3 + k_4) [A] [B]}$$

De: K_{cat}^A :

$$\frac{k_{-2} + k_3}{k_2 k_3} \quad y \quad \frac{k_3 + k_4}{k_3 k_4}$$

Lím K_M^A : k_{-1}/k_1
B?0

Lím K_M^A : $\frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)} \cdot k_1 \cdot k_{-1}$
B?8

$[lím p]^{-1} = \frac{?_3}{E_0} \left[\frac{k_{-2} + k_3}{k_2 k_3 [B]} + \frac{k_3 + k_4}{k_3 k_4} \right]$
A?8

$K_3 < k_{-2} \cdot \frac{k_{-2}}{k_2 k_3}$

PARÁMETROS CINÉTICOS

Especie	Isoenzima	[A] k_{cat} s^{-1}	[A] k_{cat} s^{-1}	[A] $K_M([B]=15\mu M)$ mM
Porcino	MOA	6.0 +/- 2	(4.4+/-0.6)x10 ⁻³	12.0+/-0.3
“	MOB	6.0 +/- 0.02	(2.0+/-0.3)x10 ⁻³	12.0+/-0.2
Humano		2.3x10 ⁻³	4.4x10 ⁻³	569
		[B] $K_M ([A]=6mM)$ mM	$(k_{cat}/K_M)_A$	$(k_{cat}/K_M)_B$
Porcino	MOA	0.52+/-0.05	$M^{-1}s^{-1}$ 500+/-10	$M^{-1}s^{-1}$ 10+/-2
“	MOB	0.39+/-0.06	500+/-10	5+/-1
Humano		5.8x10 ⁻⁵	3.9x10 ⁻⁶	76.4
Porcino	MOA	k_1 $M^{-1}s^{-1}$ 3.3+/-1.0	k_{-1} s^{-1} 0.44+/-0.16	k_2 $M^{-1}s$ (3.2+/-1.1)x10 ⁴
“	MOB	2.4+/-1.7	3.7+/-2	(6.2+/-3.1)x10 ⁵
humano		1840+/-370	43+/-10	429+/-90
		k_{-2} s^{-1}	k_3 s^{-1}	k_4 s^{-1}
Porcino	MOA	0.74+/-0.3	(5.4+/-0.6)x10 ⁻³	-3

“ humano	MOB	0.95+/-1.5	(2.02+/-0.03)x10 ⁻³	(1.23+/-0.1)x10
		(2.5+/-0.5)x10 ⁻³	(17+/-1)x10 ⁻³	(1.23+/-0.1)x10 ⁻³ (6+/-1)x10 ⁻³